

Der Einfluß des pH, der Temperatur und der Polarität des Lösungsmittels auf die Absorption des reduzierten und oxidierten Nicotinamidadenin-dinucleotids bei 260 nm

Influence of pH, Temperature and Polarity of the Solvent on the Absorption of NADH⁺ and NADH at 260 nm.

Erwin Schauenstein, Wolfram Saenger, Rudolf Jörg Schaur, Gernot Desoye und Wolfgang Schreibmayer

Institut für Biochemie der Universität Graz, Österreich und Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **35 c**, 76–79 (1980); eingegangen am 30. März/26. September 1979

NAD⁺, NADH, UV-Absorption, Temperatur, Methanol, Enthalpy of Conformational Change

Assuming a reversible equilibrium of an unfolded and a base-stacked conformation of both NADH and NAD⁺ the influence of pH, temperature and methanol on this equilibrium was studied as indicated by the UV-absorption of the adenine band at 260 nm. By the addition of methanol as well as by an increase of temperature the equilibrium is shifted to the unfolded conformation. An increase of the H⁺ concentration seems to favor the unfolded conformation in the case of NAD⁺ while for NADH a decrease of the absorption coefficient is pointing to a higher percentage of the stacked conformation at lower pH.

From the temperature variation of the absorption coefficients the enthalpies for the conformational change were calculated and compared with data obtained by different methods.

Problemstellung

Für die Konformation in wässriger Lösung wird sowohl für das oxidierte als auch für das reduzierte Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺ bzw. NADH) ein Modell diskutiert, das ein reversibles Gleichgewicht zwischen einer offenen, gestreckten und einer spiralförmig geschlossenen Konformation vorsieht [1]. Die vorliegende Untersuchung geht von der Annahme aus, daß die intensive UV-Absorption des Adeninringes mit dem Maximum bei 260 nm, die im Falle des NAD⁺ noch durch die Absorption des Pyridinringes verstärkt wird, sehr empfindlich auf Verschiebung dieses Gleichgewichtes reagieren sollte, da bei der spiraligen Konformation der Adeninring in Wechselwirkung mit dem Pyridin- bzw. Dihydropyridinring tritt, was zu einer Verminderung der Absorption führen müßte. Es wurde die Frage studiert, in welcher Weise sich Änderungen der H⁺-Konzentration, der Temperatur und der Polarität des Lösungsmittels (Zusatz von Methanol) auf die Absorption von NAD⁺ bzw. NADH bei 260 nm und damit auf das Konformationsgleichgewicht auswirken. Aus der Temperaturabhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten sollte die Enthalpie der Konformationsänderung errechnet werden.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. Schauenstein.

0341-0382/80/0100-0076 \$ 01.00/0

Material und Methoden

NAD⁺ (100%) und NADH (99% Reinheit) stammen von Boehringer Mannheim.

Der verwendete Phosphatpuffer enthielt KH₂PO₄ und K₂HPO₄ 0,1 M und hatte einen pH-Wert von 6,85.

Methanol p. a. wurde in einer Konzentration von 7,4 M bzw. 12,3 M dem Phosphatpuffer zugesetzt.

Die Einstellung der unter Punkt a) der Ergebnisse genannten pH-Werte erfolgte durch Zugabe von 0,1 M HCl, bzw. 0,1 M KOH zum Lösungspuffer. Die UV-Messungen wurden in einem Zeiss-PM 6-Spektrophotometer durchgeführt. Für die Messung der pH-Abhängigkeit der Purinbande wurden von beiden Nukleotiden Stammlösungen in destilliertem Wasser angesetzt (0,5 mM). 1 Volumteil Stammlösung wurde sodann mit 5 Volumsteilen Phosphatpuffer vermischt, der vorher auf die gewünschten pH-Werte gebracht worden war und nach Durchmischen sofort die Absorption bei 260 nm gemessen.

Die Messungen der Temperaturabhängigkeit wurden in der Weise durchgeführt, daß NAD⁺- bzw. NADH-Einwaagen in 100 ml Phosphatpuffer gelöst wurden (10⁻³ M). In die Messküvetten kamen nun 2 ml vortemperierten Phosphatpuffers; nach 10 min Angleichen wurde 0,1 ml der NAD⁺- bzw. NADH-Lösung zupipettiert und nach Durchmischen in der Küvette (1 cm) die Messung begonnen.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Zur Messung des Methanol-Effektes wurden 3 ml Methanol in einem 10 ml-Messkolben mit 0,2 ml der NAD⁺- bzw. der NADH-Lösung gemischt und mit Phosphatpuffer aufgefüllt. Endkonzentration an Methanol 7,4 M bzw. 12,3 M. Vergleichslösung: wie beschrieben jedoch ohne Nukleotidzusatz.

Ergebnisse

a) Messungen bei verschiedenen pH-Werten

Um aus der Intensität der Nukleotidbande Rückschlüsse auf die Konformation ziehen zu können war es zunächst notwendig, die Stabilität der Substanzen, insbesondere des NADH bei verschiedenen pH-Werten sicherzustellen. Als Test verwendeten wir die Funktion als Cosubstrat der L-Glutamat-dehydrogenase. Es zeigte sich, daß diese Funktion im üblichen Enzymtest [2] innerhalb des hier genannten pH-Gebietes nach maximal 30 sec noch zumindest zu 98% erhalten bleibt.

Die letzte Spalte von Tab. I zeigt die Hypochromie der NADH-Bande. Wie man sieht, nimmt der Effekt mit sinkendem pH zu; von pH 8,5 auf 6,85 ist die Zunahme mit $2p > 0,05$ noch nicht signifikant, von pH 6,85 auf 4,00 dagegen mit $2p < 0,001$ hochsignifikant (zweiseitiger Student-t-Test).

b) Messungen bei verschiedenen Temperaturen

Die Ergebnisse sind in Tab. II zusammengefaßt.

c) Messungen nach Methanol-Zusatz

Die Ergebnisse bringt Tab. III.

Der Unterschied zwischen ϵ_{\max} von NAD⁺ ist mit $2p < 0,05$ signifikant, zwischen ϵ_{\max} von NADH mit $2p < 0,008$ hochsignifikant.

Die ohne und mit Methanol festgestellten Hypochromie-Effekte ($\Delta\epsilon$) unterscheiden sich mit $2p < 0,80$ praktisch nicht voneinander.

Tab. I. Die Intensitäten der Purinbande bei 260 nm sind in Tab. I zusammengestellt. Mittlere molare dekadische Extinktionskoeffizienten von NAD⁺ und NADH bei 260 nm gemessen bei verschiedenen pH-Werten. $s_{1,2}$ = Standardabweichung; n = Zahl der Einzelmessungen; $s^* = \sqrt{s_1^2 + s_2^2/n'}$; n' bedeutet die jeweils größere Zahl von Einzelmessungen. Dimension für ϵ : [$l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$].

pH	NAD ⁺		NADH		$\Delta\epsilon \pm s^*$
	$\epsilon_{\max} \pm s_1$	n	$\epsilon_{\max} \pm s_2$	n	
4,00	17 596 \pm 40	4	14 180 \pm 80	7	3416 \pm 34
6,85	17 336 \pm 18	4	14 390 \pm 160	8	2946 \pm 57
8,50	17 330 \pm 10	3	14 510 \pm 180	7	2820 \pm 68

Tab. II. Maximumsextinktionen von NAD⁺ und NADH bei 260 nm in Phosphatpuffer pH 6,85 in Abhängigkeit von der Temperatur. Symbole wie unter Tab. I beschrieben.

t [°C]	NAD ⁺		NADH		$\Delta\epsilon \pm s^*$
	$\epsilon_{\max} \pm s_1$	n	$\epsilon_{\max} \pm s_2$	n	
0	16 686 \pm 225	7	13 627 \pm 155	8	3041 \pm 97
5	16 810 \pm 174	5	13 810 \pm 290	11	3000 \pm 102
15	17 408 \pm 102	5	14 352 \pm 17	5	3056 \pm 46
20	17 690 \pm 276	6	14 462 \pm 125	5	3228 \pm 124
25	17 819 \pm 176	9	14 506 \pm 109	9	3313 \pm 69
30	17 936 \pm 141	7	14 623 \pm 161	9	3313 \pm 71
35	18 051 \pm 201	11	14 744 \pm 141	11	3307 \pm 74
45	18 192 \pm 319	7	14 796 \pm 225	6	3396 \pm 148
60	18 195 \pm 260	8	14 902 \pm 219	9	3293 \pm 113
75	18 164 \pm 76	12	14 944 \pm 167	11	3220 \pm 53

Tab. III. Maximumsextinktionen von NAD⁺ und NADH bei 260 nm in Abhängigkeit von Methanol-Zusatz. Symbole wie in der vorhergehenden Tabelle. Vergleich: PO₄-Puffer ohne und mit 7,4 M Methanol.

MeOH	NAD ⁺		NADH		$\Delta\epsilon \pm s^*$
	$\epsilon_{\max} \pm s_1$	n	$\epsilon_{\max} \pm s_2$	n	
0	17 446 \pm 265	4	14 379 \pm 117	4	3067 \pm 145
7,4 M	17 987 \pm 119	4	14 961 \pm 105	4	3026 \pm 79
12,3 M	18 003 \pm 90	4	14 983 \pm 144	4	3020 \pm 85

Diskussion

Die Werte der Tab. I zeigen, daß die mit steigender H⁺-Ionenkonzentration eintretende Zunahme der Hypochromie dadurch zustande kommt, daß einerseits die NAD⁺-Absorption zunimmt, die NADH-Absorption dagegen abnimmt. Faßt man das Absinken der Extinktion als Ausdruck eines verstärkten Basen-Stackings bzw. einer Zunahme der spiraligen Konformation auf, so ergibt sich, daß die Erhöhung der H⁺-Konzentration bei NAD⁺ die entfaltete Konformation begünstigt, bei NADH dagegen die spiralige. Der Effekt bei NAD⁺ scheint verständlich, denn von pH 7 bis pH 4 wächst der Anteil mit protoniertem Adenin-Ring beträchtlich, der vom positivierten Pyridin-Stickstoff elektrostatisch abgestoßen werden dürfte. Zur gleichen Auffassung gelangte Sarma [3] auf Grund von NMR-spektroskopischen Befunden, wobei das Proton auf N₁ des Adenin-Ringes lokalisiert wurde. Catterall [4] fand ferner, daß die Protonierung des Adenin-Ringes bei NADH das Entfalten nicht begünstigt.

Auch Thornton [5] wies auf die durch erhöhte H⁺-Ionenkonzentration bewirkte Entfaltung von

NAD⁺ hin, bei der nur der adenintragende Molekülteil eine Konformationsänderung erfährt.

Eine plausible Erklärung für die Begünstigung der gefalteten Form des NADH bei kleinen pH-Werten erscheint derzeit jedoch nicht möglich.

Auch Methanol-Zusatz begünstigt signifikant bzw. hochsignifikant die offenen Formen, zum Unterschied vom bereits genannten pH-Effekt jedoch gleich stark bei NAD⁺ und bei NADH, so daß die bereits unter Normalbedingungen festgestellte Hypochromie praktisch unverändert bleibt. Auch in diesem Fall entsprechen die UV-Befunde den vorangegangenen NMR-Befunden, nach denen mit steigender Methanolkonzentration ein fortschreitendes Entfalten bei NAD⁺ und NADH eintritt (Catterall [4]).

Zu gleichen Aussagen kamen auch Freed *et al.*, 1967 [6], Torreilles *et al.*, 1974 [7], Thornton 1977 [5] und Saenger 1977 [8].

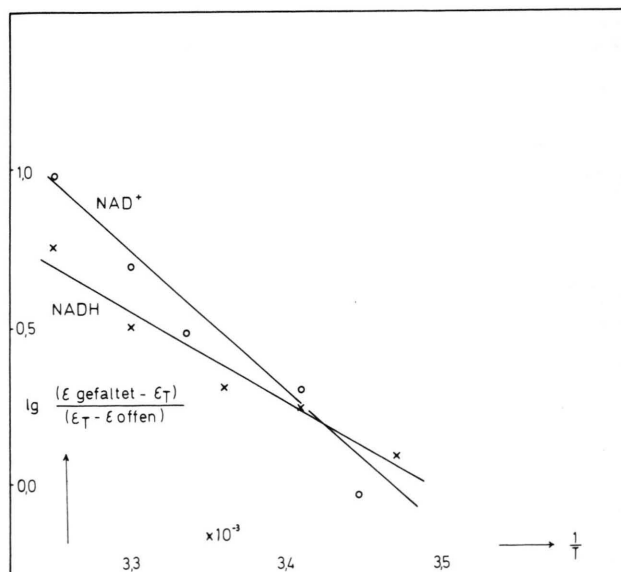
Aufgrund der Ergebnisse von Malcolm [9] sowie von Siegel *et al.* [10] und Czerlinsky *et al.* [11] sind intermolekulare Wechselwirkungen unter den gewählten Bedingungen nicht anzunehmen.

Die Erhöhung der Temperatur bewirkt sowohl bei NAD⁺ als auch bei NADH einen Extinktionsanstieg. Im Sinne unserer Auffassung bedeutet dies eine Begünstigung der entfalteten Formen. Unter der Voraussetzung, daß die beiden Moleküle bei der niedrigsten bzw. höchsten Meßtemperatur als praktisch vollständig in der gefalteten bzw. entfalteten

Konformation vorliegend betrachtet werden können, lassen sich aus van't Hoff-Auftragungen der molekularen Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Temperatur die Enthalpien für die Konformationsänderungen errechnen. Die Auftragung von $\lg (\epsilon_{\text{gefaltet}} - \epsilon_T) / (\epsilon_T - \epsilon_{\text{offen}})$ gegen $1/T$ führt zu einer Geraden mit der Steigung $\Delta H^\circ / 2,303 R$ (mit $\epsilon_{\text{offen}} = \epsilon$ bei 60 °C (für NAD⁺) bzw. 75 °C (für NADH); $\epsilon_T = \epsilon$ bei der Temperatur T (°K); $\epsilon_{\text{gefaltet}} = \epsilon$ bei 0 °C und R = allgemeine Gaskonstante).

Abb. 1 zeigt das Ergebnis dieser Rechnung für NADH und NAD⁺. Die nach der Methode der kleinsten Quadrate berechneten Geraden weisen deutlich unterschiedliche Steigungen auf, aus denen sich die Enthalpien für die Konformationsumlagerungen zu 54,5 kJ/mol für NADH und 83,9 kJ/mol für NAD⁺ errechnen. Der für NADH erhaltene Wert steht in ausgezeichneter Übereinstimmung mit einem von Malcolm [9] nach derselben Methode, jedoch bei einer Wellenlänge von 315 nm erhaltenen Wert von 52,3 kJ/mol. Obwohl andere, bei Malcolm zitierte Verfahren zu stark differierenden Enthalpie-Werten für NADH führen (23 kJ/mol aufgrund der chemischen Verschiebung im NMR-Spektrum; 69 kJ/mol aus der Messung der CD-Bande bei 260 nm; 10 kJ/mol aufgrund von Fluoreszenzmessungen mit einer Primärwellenlänge von 260 bzw. 340 nm), scheint doch der Befund bemerkenswert, daß der von uns unter identischen

Abb. 1. Auftragung von $\lg_{10} (\epsilon_{\text{gefaltet}} - \epsilon_T) / (\epsilon_T - \epsilon_{\text{offen}})$ gegen die reziproke absolute Temperatur für NAD⁺ und NADH.



Bedingungen für NAD⁺ erhaltene Wert um 54% über jenem für NADH liegt. Bei Gültigkeit des Modells mit den beiden Konformationen weist diese Erhöhung auf eine höhere Stabilität der gefalteten Konformation des NAD⁺ hin. Diese wäre dadurch erklärbar, daß die Aromatizität des Pyridinringes im NAD⁺ die Ausbildung eines Sandwich-Komplexes mit dem Purinring begünstigt. In vorangegangenen Untersuchungen [9] war die Absorption des Nicotinamids im Bereich von 300 bis 380 nm für die Bestimmung der Enthalpie der Konformationsänderung lediglich von NADH herangezogen worden.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals auch die Bande bei 260 nm, die überwiegend dem Adenin zu-

zuordnen ist, absorptionsphotometrisch für die Erkennung von Konformationsänderungen sowohl von NADH wie auch NAD⁺ ausgewertet.

Sie zeigt auch bei Temperaturerhöhungen jene Änderungen an, die aufgrund von NMR-Befunden früherer Autoren zu erwarten waren. In mehreren Arbeiten war gefunden worden, daß Temperaturerhöhung die Entfaltung des Moleküls sowohl bei NAD⁺ wie auch bei NADH begünstigt [12–14]. Das UV-Spektrum bietet die wesentlich einfachere und raschere Möglichkeit exakter quantitativer Vergleiche.

- [1] R. H. Sarma u. R. J. Mynott, Proc. Jerusalem Symp. V, (E. D. Bergmann u. B. Pullman, Hrsg.), 591–626, Academic Press, New York 1973.
- [2] H. U. Bergmeyer u. E. Bernt, Methoden der enzymatischen Analyse (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), 1624–1627, Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- [3] R. H. Sarma, V. Ross u. N. O. Kaplan, Biochemistry 7 (9), 3052 (1968).
- [4] W. A. Catterall, D. P. Hollis u. C. F. Walter, Biochemistry 8 (10), 4032 (1969).
- [5] J. M. Thornton u. P. M. Bayley, Biopolymers 16, 1971 (1977).
- [6] S. Freed, E. A. Neyfakh u. L. A. Tummerman, Biochim. Biophys. Acta 143, 432 (1967).
- [7] J. Torreilles u. A. C. De Paulet, Biochim. Biophys. Acta 362, 375 (1974).
- [8] W. Saenger, B. S. Reddy, K. Mühlenegger u. G. Weimann, Pyridin Nucleotide-Dependent Dehydrogenases, W. de Gruyter Co., Berlin, New York 1977.
- [9] A. D. B. Malcolm, Anal. Biochem. 55, 278 (1973).
- [10] J. Siegel u. G. Montgomery, Arch. Biochem. Biophys. 82, 2888 (1959).
- [11] G. Czerlinsky u. F. Hommes, Biochim. Biophys. Acta 79, 46 (1964).
- [12] O. Jardetzky u. N. G. Wade-Jardetzky, J. Biol. Chem. 241 (1), 85 (1966).
- [13] R. H. Sarma u. N. O. Kaplan, Biochemistry 9 (3), 539 (1970).
- [14] B. M. Birdsall, Ph. D. Thesis, Cambridge University 1973.